

Artikelen

Manipulatie van tumorcelkinetiek met polyamine synthese-remmers

F.A.J. MUSKIET en B. DORHOUT

De polyaminen putrescine, spermidine en spermine zijn normale bestanddelen van alle cellen. Remming van één van de sleutelenzymen in de polyamine-synthese, ornithine decarboxylase, met α -difluoromethylornithine (DFMO) veroorzaakt polyamine depletie in gekweekte (tumor)cellen. De depletie gaat gepaard met een groeistop en accumulatie in de G_0/G_1 fase van de celcyclus. Daaropvolgende toediening van polyaminen leidt tot synchrone verschijning van de cellen in de S-fase, hetgeen kan worden geëxploiteerd door toediening van S-fase specifieke cytotoxische stoffen. Wij onderzoeken in tumordragende proefdieren of dit concept gebruikt kan worden om de effectiviteit van conventionele chemotherapie te verhogen. Een door DFMO geïnduceerde tumor groeistop kan in vivo echter slechts bereikt worden door additionele behandeling met een polyamine-arme voeding, niet-resorbeerbare antibiotica en een remmer van polyamine-oxylase. Dit bleek nodig om de opname van polyaminen uit het maagdarmlkanaal en polyaminen die uit de retroconversie route stammen te beperken. Onder deze omstandigheden accumuleren intraperitoneaal groeiende L1210 tumorcellen in G_0/G_1 . Lewis Long Carcinoma cellen die als solide tumor groeien vertonen echter geen veranderingen in celcyclus fase verdeling. Studies met 4-amidinoindan-1-on 2'-amidinohydrazon (CGP 48664A), een recent ontwikkelde remmer van het tweede sleutelenzym, genaamd S-adenosylmethionine decarboxylase, tonen een nagenoeg volledige effectieve L1210 groeistop, die echter niet gepaard gaat met veranderingen in de celcyclus fase-distributie. Een volledige L1210 groeistop met accumulatie in G_0/G_1 wordt verkregen door gecombineerde behandeling met DFMO en CGP 48664A.

Eén van de oorzaken van de (toch nog) teleurstellende effectiviteit van niet-chirurgische behandelingen van maligniteiten is het gebrek aan specificiteit. Deze wordt uitgedrukt in de z.g. therapeutische index, zijnde de ratio tussen het effect op tumorcellen en het effect op "normale" cellen. Ten dele wordt dit veroorzaakt door gebrek aan kennis van de verschil-

len tussen tumorcellen en normale cellen. Meestal blijkt slechts een gedeelte van de tumorcellen gevoelig voor chemotherapie. De oorzaken hiervan zijn gelegen in reeds bestaande of verworven resistentie tegen de gebruikelijke cytostatica en de moeilijke bereikbaarheid van sommige tumorcelpopulaties voor het cytostaticum ("pharmacological refuges").

Bij gebrek aan specifieke aangrijpingspunten ligt het voor de hand om de chemotherapeutische behandeling van maligniteiten te richten op delende cellen. Het probleem is echter dat, in tegenstelling tot populaire opvattingen, de meeste tumoren slechts langzaam delen en dat er zich dus op een bepaald tijdstip slechts weinig cellen in de delingscyclus bevinden. Ons huidig polyamine-onderzoek heeft als doel het verhogen van de effectiviteit van klassieke fase-specifieke chemotherapie door het percentage tumorcellen in de gevoelige fase te verhogen door middel van het synchronisatie/recruterings concept. Daarbij wordt gebruik gemaakt van het belang van polyaminen tijdens de celdeling (zie "therapeutische strategie"). Het betreft hier een oud concept dat met name geënt is op de tumorcelkinetische waarnemingen in tumordragende proefdieren tijdens behandeling met fase specifieke chemotherapie (zie volgende alinea).

Cellen (1) bevinden zich in de rustfase (G_0 -fase) of in de delingscyclus. Deze cyclus wordt onderverdeeld in: G_1 -fase (pré-S-fase), S-fase (DNA-synthesefase), G_2 -fase (pré-M-fase) en M-fase (delingsfase; onderverdeeld in pro-, meta-, ana- en telofase). Op grond van hun DNA-gehalte onderscheiden we de G_0/G_1 ($n=1$), S- $(1 < n < 2)$ en G_2/M ($n=2$) fasen. De groeifractie is dat deel van de cellen dat zich in de delingscyclus bevindt. Vanuit de celcyclus bezien worden niet-chirurgische therapieën van maligniteiten klassiek onderverdeeld in aspecifieke, fase-specifieke en cyclus-specifieke behandelingen. Deze indeling berust op verschillen in het gedrag van normale hemopoëtische cellen (met een lage groeifractie) en een transplantabel lymfoom (met een 100% groeifractie) tijdens diverse behandelingen in vivo. Aspecifieke behandeling (voorbeelden: bestraling, stikstof-mosterd) is gedefinieerd als een therapie die, onafhankelijk van de dosis, een gelijk effect heeft op normale tumorcellen. Met andere woorden, de therapeutische index bedraagt 1. Fase-specifieke chemotherapie (voorbeelden: cytosine arabinoside, hydroxyureum, methotrexaat, vincristine) doodt cellen die zich in één of meerdere fasen van de celcyclus bevinden. Bij toenemende dosis zal vanaf het moment dat alle cellen

Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium, Academisch Ziekenhuis Groningen

Correspondentie: Dr. F.A.J. Muskiet, Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium Academisch Ziekenhuis, Postbus 30.001, 9700 RB Groningen.

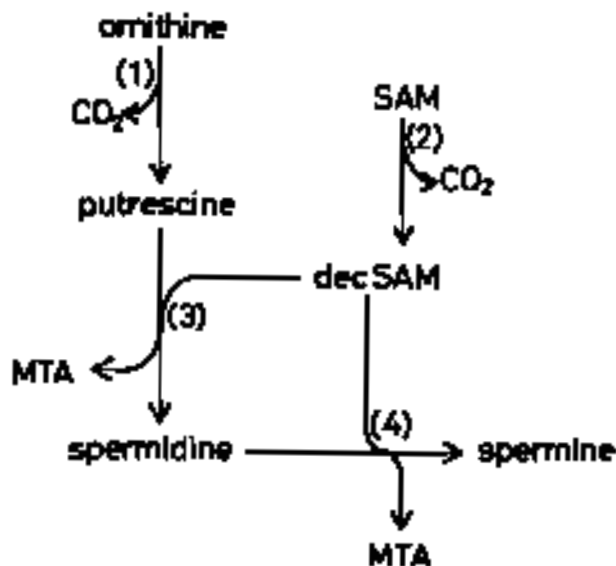
in de gevoelige fase gedood zijn een plateau in het effect optreden. De therapeutische index bedraagt >1. Cyclus-specifieke chemotherapie (voorbeeld: cyclofosfamide) doodt cellen die zich in de celcyclus bevinden; ook hierbij bedraagt de therapeutische index >1.

Een sprekend voorbeeld van het synchronisatie/recruteringsconcept treedt op in een chemisch-geïnduceerde transplantabele acute myeloïde leukemie (ML) in de bruine Noorse (BN) rat (BNML model) (2). Dit model vertoont grote gelijkheid met de acute myeloïde leukemie in de mens. Behandeling van BNML ratten met de overwegend S-fase specifieke cytotoxische stof cytosine arabinoside (Ara-C) doodt voornamelijk ML-cellen die zich in de S-fase bevinden. Het verdwijnen van S-fase ML-cellen heeft tot gevolg dat vervolgens een hoger dan normaal aantal in de S-fase intreedt. Vóór behandeling bedraagt het percentage S-fase cellen ongeveer 20%; 12 uur na behandeling is dit ongeveer 50%. Een éénmalige behandeling met Ara-C heeft dus tot gevolg dat de ML-populatie deels gesynchroniseerd wordt. Hiermee is de tumor 12 uur na behandeling gevoeliger geworden voor Ara-C dan vóór behandeling. Het is niet duidelijk of dit veroorzaakt wordt door een kortstondige ophoping van ML-cellen in de G₁-fase, dan wel dat er een hoger dan normaal aantal ML cellen vanuit de G₀-fase intreedt in de cyclus (een proces dat recruteringsconcept in de kliniek niet bruikbaar. Het is evenwel mogelijk dat enkele op empirische gronden effectief gebleken cytostatische schema's (b.v. voor acute myeloïde leukemie en non-Hodgkin lymfoma) op dit concept gebaseerd zijn. Recent is dit oude, doch nog steeds valide, concept weer in de belangstelling gekomen onder andere door het gebruik van cytokines als stimulators van tumorgroei (3).

In deze bijdrage bespreken we aan de hand van de literatuur de functie van polyaminen, polyaminehomeostase, polyaminen als doelwit in de oncologie en onze therapeutische strategie. Vervolgens gaan we kort in op de door ons ontwikkelde polyamine-analyses en onze resultaten van het gebruik van polyaminen en hun metabolieten als "tumormarkers". Uitgebreider bespreken we onze resultaten van het gebruik van polyaminesynthese-remmers als monotherapie en van het huidige gebruik van combinaties van polyaminesynthese-remmers.

Polyamine functie en homeostase

De polyaminen putrescine, spermidine en spermine zijn laagmoleculaire alifatische aminen die in alle cellen voorkomen (4). Vanwege hun polykationkarakter hebben ze de neiging zich intracellulair te associëren met polyanionen, zoals eiwitten, fosfolipiden en met name RNA en DNA. Van de exacte functie van polyaminen is nog weinig bekend. Het is echter duidelijk dat ze op één of andere manier betrokken zijn bij groei. Biomedisch onderzoek aan polyaminen richtte zich aanvankelijk op hun gebruik als tumormarkers (5). Huidig onderzoek is voornamelijk gericht op het veroorzaken van polyaminedepletie als



Figuur 1. Polyamine biosynthese. Putrescine: 1,4-diaminobutaan. Spermidine: $H_2N^1(CH_2)_3NH(CH_2)_4N^8H_2$. Spermine: $H_2N^1(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3N^{12}H_2$. Dec SAM: gedecarboxyleerd S-adenosylmethionine. SAM: S-adenosylmethionine. MTA: 5'-methylthioadenosine. (1): ornithine decarboxylase, ODC; (2): S-adenosylmethionine decarboxylase, SAMDC; (3): spermidine synthase; (4): spermine synthase. DFMO: α -difluoromethylornithine remt ODC, waardoor geen putrescine gevormd kan worden. Het 4-amidinoindan-1-on 2'-amidinohydrazon (CGP 48664A) remt SAMDC, waardoor geen dec SAM gevormd kan worden voor de synthese van spermidine en spermine.

therapeutische modaliteit bij maligniteiten en parasitaire infectieziekten (4, 6-8). Recent is daaraan toegevoegd onderzoek van polyaminen als groei- en maturatiefactoren in de neonatologie. Deze onderzoeksgebieden vereisen inzicht in de cellulaire polyaminehomeostase.

Polyaminen stammen uit de voeding, bacteriële synthese in het maagdarmkanaal (9, 10), de novo synthese (4, 6-8) en "retroconversie" (11). De cellulaire polyaminehomeostase wordt gereguleerd door de novo synthese, opname (12, 13), retroconversie en terminale afbraak (10). Putrescine wordt gesynthetiseerd (figuur 1) uit ornithine (ornithine decarboxylase; ODC). Spermidine en spermine worden gesynthetiseerd uit respectievelijk putrescine (spermidine synthase) en spermidine (spermine synthase) door aanhechting van een aminopropylgroep aan één van hun primaire stikstofatomen. De aminopropylgroep stamt uit gedecarboxyleerd S-adenosylmethionine, dat op zijn beurt voortkomt uit S-adenosylmethionine (S-adenosylmethionine decarboxylase; SAMDC). ODC en SAMDC zijn de sleutelenzymen in de polyamine synthese. Er zijn diverse factoren (o.a. hormonen) die snelle ODC en SAMDC inductie kunnen veroorzaken. De in vivo halfwaardetijden van ODC en SAMDC behoren tot de kortste die tot nu toe bekend zijn (respectievelijk ± 20 en 50 minuten). Deze eigenschappen suggereren dat strikte regulatie van intracellulaire polyaminegehalten belangrijk is.

Onze voeding bevat, afhankelijk van de samenstelling, aanzienlijke hoeveelheden polyaminen. Recent is belangstelling ontstaan in de moedermelk-(14) en

flessemelkgehaltenes. Bacteriën in ons maagdkanaal synthetiseren polyaminen voor eigen gebruik (biosynthese), doch eveneens voor biodegradatieve doeleinden. Laatstgenoemde treedt met name op als de pH van hun omgeving daalt, zoals bijvoorbeeld bij bacteriële fermentatie van koolhydraten in het colon. Hierbij trachten de bacteriën de pH te doen stijgen door onder andere decarboxylering van aminozuren. Zo ontstaan bijvoorbeeld uit decarboxylering van histidine, lysine en ornithine respectievelijk histamine, cadaverine (1,5-diaminopentaan) en putrescine. Alternatieve biodegradatieve putrescinesynthese in bacteriën geschiedt door decarboxylering van arginine en daaropvolgende deïminering tot putrescine. Polyaminen in de voeding en bacteriële polyaminen kunnen in de mucosa van het maagdkanaal worden afgebroken (diamine-oxydase; zie hieronder) of worden geresorbeerd. Via de circulatie komen ze ter beschikking van andere cellen. Opname geschiedt via carriergemediëerde transportmechanismen. Van de transporteiwitten en de factoren die de biologische beschikbaarheid van gastroïntestinale polyaminen bepalen is momenteel nog niet veel bekend. Er zijn echter aanwijzingen dat polyamine transport snel geïnduceerd en uitgeschakeld kan worden.

Door middel van "retroconversie" van spermine naar spermidine en spermidine naar putrescine conserveren cellen de spermidine- en putrescinedelen van hun respectievelijke voorlopers (figuur 2). De route omvat een initiële acetylering van een primaire stikstof. Regulatie geschiedt door snelle inductie en uitschakeling van de onderliggende N-acetyltransferases. In een tweede stap volgt afsplitsing van de aldus ontstane N-acetylaminopropylgroep (polyamine-oxydase). Door biosynthese en retroconversie, tezamen

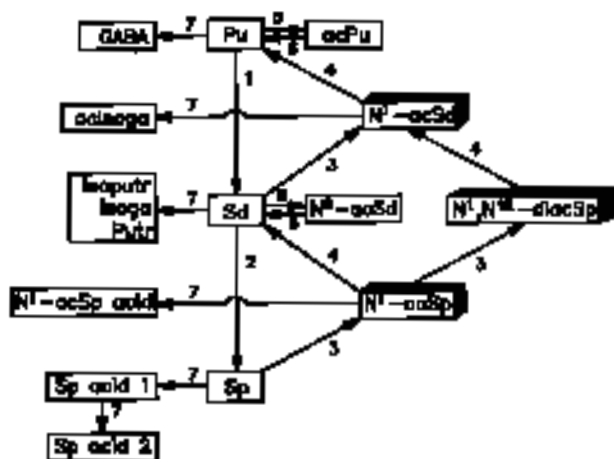
genaamd interconversie, wordt onder andere de intracellulaire polyaminesamenstelling gereguleerd en kunnen, na uitscheiding, andere cellen van polyaminen worden voorzien. Het uiteindelijke lot van polyaminen is terminale afbraak (figuur 2) en uitscheiding via met name de urine. Terminale afbraak leidt tot een scala aan metabolieten die niet meer als bouwstenen van polyaminen kunnen fungeren. De voornaamste route geschiedt via oxydatieve deaminering (Cu-bevattende amine-oxydases, waaronder diamine-oxydase) en leidt tot de z.g. non- α -aminozuur polyaminemetabolieten. Volledige afbraak vindt plaats in de grote en kleine Krebscycli en leidt tot CO_2 , water en ureum. Vanwege hun toxische eigenschappen (met name spermine) is de catabole druk hoog en worden in de urine voornamelijk non-toxische (N-acetyl) non- α -aminozuurmetabolieten en N-acetylpolyaminen aangetroffen. Opname in het maagdkanaal, conservering via retroconversie, hoge catabole druk en de induceerbaarheid van de diverse systemen maken dat de 24 uren urine-uitscheiding van polyaminen, N-acetylpolyaminen en hun metabolieten geen eenvoudige relatie tot de polyamine "turnover" in het lichaam vertonen.

Polyamine metabolisme als doelwit in de oncologie

Vanwege hun rol bij groei is het polyaminemetabolisme een voor de hand liggend doelwit voor cytostatische/cytotoxische therapie. In dit grote veld kunnen grofweg twee stromingen worden onderscheiden: gebruik van polyamine-analoga (6, 8) en polyaminesynthese-remmers (4, 6-8). Beide trachten depletie van de intracellulaire natuurlijke polyaminen te bewerkstelligen.

Het ideale analogon wordt opgenomen via het specifieke polyaminetransportsysteem, competeert daarvoor dus met opname van natuurlijke polyaminen, "down"-reguleert de polyaminesynthese via negatieve terugkoppeling, "up"-reguleert afbraak van de natuurlijke polyaminen en bezet polyaminebindingsplaatsen doch vervult daarbij niet de nog onbekende functie bij groei. Er is reeds een scala aan polyamine-analoga gesynthetiseerd en enkele lijken veelbelovend.

Remmers van de polyaminebiosynthese worden reeds langer bestudeerd dan analoga. Hiertoe zijn specifieke remmers van nagenoeg alle hierbij betrokken enzymen beschreven. Vanwege hun sleutelrol worden remming van ODC en SAMDC het meest intensief bestudeerd. De bekendste remmer van ODC, α -difluoromethylornithine (DFMO), werkt via het principe van de zeer specifieke "enzymgeactiveerde zelfmoord". Hierbij wordt DFMO slechts door ODC herkend en gedecarboxyleerd tot een zeer reactief radicaal. Laatstgenoemde reageert vervolgens met het actieve centrum en deactiveert ODC daarmee op irreversibele wijze. Inhibitie van SAMDC wordt onder andere verkregen met de irreversibele remmer 5'-[(Z)-4-amino-2-butenyl]methylamino}-5'-deoxyadenosine (Abe-Ado) en het recent ontwikkelde 4-amidinoindan-1-on 2'-amidinohydrazon (CGP 48664A). Onze proeven beperken zich momenteel tot DFMO en CGP 48664A. Hierbij wordt in tumordragende proefdieren getracht om door manipulatie van het po-



Figuur 2. Polyamine retroconversie en terminale afbraak. Polyamine (conjugaten, metabolieten): acIsoga: N-acetylisoputrescine- γ -lactam; acPu: N¹-acetylputrescine; GABA: γ -aminoboterzuur; Isoga: isoputrescine- γ -lactam; Isoputr: isoputrescine; N¹-acSd: N¹-acetylspermidine; N⁸-acSd: N⁸-acetylspermidine; N¹-acSp: N¹-acetylspermine; N¹-acSp acid: N¹-acetylspermine zuur; N¹,N¹²-diacSp: N¹,N¹²-diacetylspermine; Pu: putrescine; Putr: putrescine; Sd: spermidine; Sp: spermine; Sp acid 1: spermine zuur-1; Sp acid 2: spermine zuur-2. Enzymen: 1: spermidine synthase; 2: spermine synthase; 3: cytosol spermidine/spermine N¹-acetyltransferase; 4: polyamine oxydase; 5: nucleaire acetyltransferase; 6: acetylhydrolase; 7: Cu-bevatende amine oxydase/aldehyde dehydrogenase.

lyaminemetabolisme de effectiviteit van conventionele cytotoxische stoffen te verhogen.

Therapeutische strategie

In vitro behandeling van delende (tumor)cellen met polyamine synthese-remmers (met name ODC-remmers) veroorzaakt een polyaminetekort ("depletie"). Deze depletie gaat gepaard met een sterke remming van de groei (een cytostatisch, geen cytotoxisch effect), die in de meeste gevallen veroorzaakt wordt door een sterk verlengde verblijftijd ("accumulatie") van de cellen in de G₀/G₁-fase van de celcyclus. De reden is dat cellen vóór hun intrede in de S-fase eerst polyaminen dienen te synthetiseren en/of moeten opnemen uit het medium. Indien vervolgens polyaminen aan het medium worden toegevoegd wordt de polyaminedepletie acuut opgeheven ("repletie") en betreden de groeigeremde G₀/G₁-fase-cellen simultaan de S-fase; i.e. de cellen zijn gesynchroniseerd. Toevoeging van een S-fase specifieke cytotoxische stof op dit moment resulteert in vernietiging van een groter deel van de tumorcelpopulatie dan wanneer de voorafgaande manipulatie van het polyamine metabolisme niet was toegepast. De effectiviteit van de chemotherapie is hiermee dus verhoogd.

In vivo veroorzaakt polyaminedepletie/repletie potentieel gelijktijdige synchronisatie van normale cellen. De hiervoor gevoelige cellen zullen voornamelijk behoren tot weefsels die gekarakteriseerd worden door hoge "celturnover" (b.v. beenmerg, mucosa). Deze weefsels zullen eveneens door de cytotoxische stof worden getroffen en er zal geen winst zijn in therapeutische index. Het is echter te verwachten dat normale cellen zich vanwege hun groeiregulatie in mindere mate laten synchroniseren/recruteren. Tijdelijke specifieke bescherming door behandeling met proliferatieremmende cytokines is een andere optie. Verschillen in synchronisatie-kinetiek (i.e. verschillen in celcyclustijd) tussen normale- en tumorcellen kunnen geëxploiteerd worden door toediening van fase-specifieke cytotoxische stoffen met korte halfwaardetijden op het moment dat vooral tumorcellen zich in de gevoelige fase bevinden.

Het gevolg van polyaminedepletie/repletie is vergelijkbaar met de waargenomen synchronisatie/recrutering in het BNML-model na behandeling met een cytotoxische stof (Ara-C, zie boven). In principe is het concept van polyaminedepletie/repletie universeel bruikbaar, omdat alle (tumor)cellen gevoelig zijn voor polyaminedepletie. Of het zich ook naar de in vivo situatie laat vertalen zal de toekomst moeten uitwijzen.

Polyamine analyses en hun gebruik als tumormarkers

Voor de analyse van polyaminen, polyamine conjugaten en hun metaboliëten ontwikkelden we gaschromatografische bepalingen met stikstof/fosfor- en massaspectrometrische detectie (15-19). Met deze methoden kunnen alle polyaminen, N-acetylpolyaminen en nagenoeg alle non- α -aminozuurmetaboliëten (figuur 2) worden gemeten in cellen, weefsels en lichaamsvloeistoffen.

Bij de aanvang van ons onderzoek van polyaminen als tumormarkers richtte de internationale literatuur zich voornamelijk op de analyse van polyaminen in lichaamsvloeistoffen na hydrolyse; i.e. meting van de som van vrije en geconjugeerde polyaminen. Wij (20-26) onderzochten of analyses van N-acetylpolyaminen en terminale (N-acetyl)polyaminemetaboliëten de gevoeligheid konden verhogen. Hiervoor werd het polyaminemetabolisme nader uitgezocht. Samengevat luidt de conclusie dat extracellulaire polyaminen, N-acetylpolyaminen en hun metaboliëten, zoals vele tumormarkers, specifiek en tamelijk ongevoelig zijn voor diagnostische doeleinden, doch dat ze in geselecteerde gevallen niettemin bruikbaar zijn voor het inschatten van de therapeutische effectiviteit en het vaststellen van tumorprogressie. Terminale afbraak en hergebruik via de retroconversie route bleken de voornaamste redenen van de lage gevoeligheid.

DFMO als monotherapie

In het in vivo onderzoek met polyamine synthese-remmers maken we gebruik van tumordragende proefdier modellen, zoals de intraperitoneaal groeiende L1210 (een lymfatische leukemie) in de muis, de als solide tumor groeiende Lewis Lung Carcinoma (LLC) in de achterpoot van de muis en het reeds genoemde BNML model. Polyaminen worden gemeten met gaschromatografie. Voor het vaststellen van de celcyclus fase verdeling worden de tumorcellen ongeveer 30 minuten vóór verzameling in vivo blootgesteld aan 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU). Dit thymidine-analoon wordt specifiek ingebouwd in het DNA en markeert daarmee de S-fase-cellen. Ingebouwd BrdU wordt met een indirecte immunochemische techniek voorzien van een groen-fluorescerende marker. Hiervoor worden een monoclonaal anti-BrdU antilichaam en een polyclonaal fluoresceïne-isothiocyanaat (FITC)-geconjugerd geit-anti-muis-IgG antilichaam gebruikt. Dubbelstrengs DNA wordt voorzien van het rood-fluorescerende propidiumjodide. Met een flowcytometer worden vervolgens per cel de groen-(S-fase cellen) en rood-(hoeveelheid DNA) fluorescentie-intensiteiten gemeten. Naast proefdieren wordt gebruik gemaakt van celkweken voor beantwoording van specifieke vragen die gedurende het dierexperimenteel onderzoek naar boven komen en voor het testen van de hypothese dat remming van de polyaminesynthese de resistentie van tumorcellen tegen bepaalde cytotoxische stoffen kan opheffen.

Hoewel DFMO een krachtige remmer van ODC is, bleek het gebruik in vivo teleurstellend. We onderzochten of dit verband hield met toevoer van polyaminen uit de voeding, de polyaminesynthetische activiteit van de microbiële flora in het maagdarkanaal en de retroconversie-route (27-31). We vonden dat de tegenvallende in vivo resultaten met DFMO te wijten zijn aan opname van polyaminen uit het maagdarkanaal en, in mindere mate, polyamineretroconversie. Een volledige DFMO-geïnduceerde groeistop van L1210- en LLC-cellen kon worden verkregen indien additioneel behandeld werd met polyamine-arm voer (limitatie van polyaminen uit dieet), orale niet-resorbereerbare antibiotica (limitatie van bacteriële polyami-

nebijdrage) en een polyamine-oxydase-remmer (remming polyamine retroconversie). Hierbij accumuleerden L1210-cellen in de G₀/G₁-fase van de celcyclus, doch vertoonden LLC-cellen geen verandering in celcyclusfase verdeling. Polyamine-analyses gaven aan dat er, zoals verwacht, depletie van putrescine en spermidine optrad, doch meestal niet van spermine. Putrescine-synthese door de bacteriële flora in het colon bleek de belangrijkste oorzaak te zijn van het falen van DFMO als monotherapie.

Combinaties van polyamine synthese-remmers

Het op bovengenoemde manier verkregen cytostatische effect van DFMO als monotherapie is, vanwege de noodzaak tot volledige darm decontaminatie, niet te vertalen naar een in de kliniek hanteerbaar behandelingsprotocol. Het was aanleiding tot het bijstellen van de strategie door additionele remming van SAMDC. Deze aanpak heeft, ten opzichte van DFMO-monotherapie, het voordeel dat er geen rekening hoeft te worden gehouden met de overvloedige toevoer van putrescine uit de voeding en de gastroïntestinale bacteriële flora, omdat putrescine onder deze omstandigheden niet omgezet kan worden naar het voor groei waarschijnlijk belangrijke spermidine (figuur 1). Het recent ontwikkelde CGP 48664A was hierbij een welkome aanwinst, doch van de werkzaamheid was in de praktijk nog niets bekend. Onze huidige resultaten geven aan dat behandeling van L1210-dragende muizen met CGP 48664A-monotherapie een nagenoeg volledige effectieve L1210-groei-stop veroorzaakt (32). Accumulatie van putrescine en depletie van spermidine en spermine tonen aan dat CGP 48664A als een potente in vivo SAMDC-remmer beschouwd dient te worden. De cellen vertonen echter geen veranderingen in celcyclusverdeling (i.e. ze accumuleren niet in de gewenste G₀/G₁ fase). Dit doet met enkele andere overwegingen vermoeden dat er mogelijk eveneens een cytotoxisch "analogon effect" van CGP 48664A in het spel is. Door gebruik te maken van de combinatie van DFMO en CGP 48664A werd recent een volledige L1210-groei-stop bereikt, waarbij de cellen in de G₀/G₁ fase accumuleren (33). Op het programma staat het opheffen van de groei-stop door behandeling met het niet-toxische N¹-acetylspermine. De gedachte hierbij is dat N¹-acetylspermine na opname in de tumorcellen door polyamine oxydase omgezet kan worden in spermidine (figuur 2) en zodoende de cellen kan aanzetten tot groei. Uiteindelijk zal het concept getest worden in het op de menselijke vorm van acute myeloïde leukemie gelijkende BNML-model.

Achtergrond van het onderzoek in het CKCL-AZG

Het CKCL-AZG verricht sinds 1978 polyaminen-onderzoek. Hiervoor werden drie subsidies van het Koningin Wilhelmina Fonds (De Nederlandse Kankerbestrijding) verkregen en wordt momenteel in een "concerted action" programma van de Europese Unie samengewerkt met groepen in Zweden, Frankrijk en Schotland.

Literatuur

- Hellmann S, DeVita VT. Principles of cancer biology: kinetics of cellular proliferation. In: Cancer. Principles & practice of oncology. DeVita VT, Hellmann S, Rosenberg (eds). Lippincott Co, Philadelphia, Toronto, 1982; 4: 73-79.
- Martens ACM, Bekkum DW van, Hagenbeek A. The BN acute myelocytic leukemia (BNML). A rat model for studying human acute myelocytic leukemia (AML). *Leukemia* 1990; 4: 241-257.
- Vellenga E, Asschert L, Withoff S, Kolk D van der, Vries EGE de. VP-16-mediated cytotoxicity is modulated by interleukin-3 in a growth factor-dependent leukemic cell line. *Leukemia* 1994; 8: 2060-2064.
- Jänne J, Alhonen L, Leionen P. Polyamines: from molecular biology to clinical applications. *Ann Med* 1991; 23: 241-259.
- Bachrach U. Polyamines as markers of malignancy. In: *Progress in Drug Research*. Jucker E, ed. Birkhäuser Verlag Basel, 1992; 39: 9-33.
- Porter CW, Sufrin JR. Interference with polyamine biosynthesis and/or function by analogs of polyamines or methionine as a potential anticancer chemotherapeutic strategy. *Anticancer Res* 1986; 6: 525-542.
- McCann PP, Pegg AE, Sjoerdsma A (eds). Inhibition of polyamine metabolism. Biological significance and basis for new therapies. Academic Press, Orlando etc, 1987.
- Pegg AE. Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and as a target for chemotherapy. *Cancer Res* 1988; 48: 759-774.
- Seiler N, Sarhan S, Grauffel C, Jones R, Knödgen B, Moulinoux J-P. Endogenous and exogenous polyamines in support of tumor growth. *Cancer Res* 1990; 50: 5077-5083.
- Sarhan S, Knödgen B, Seiler N. The gastrointestinal tract as a source for tumor growth. *Anticancer Res* 1989; 9: 215-224.
- Seiler N, Bolkenius FN, Rennert OM. Interconversion, catabolism and elimination of the polyamines. *Med Biol* 1981; 59: 334-346.
- Byers TL, Pegg AE. Properties and physiological function of the polyamine transport system. *Am J Physiol* 1989; 257: 545-553.
- Seiler N, Dezeure F. Polyamine transport in mammalian cells. *Int J Biochem* 1990; 22: 211-218.
- Dorhout B, Beusekom CM van, Huisman M, Kingma AW, Hoog E de, Boersma ER, Muskiet FAJ. Estimation of twenty-four hour polyamine intake from mature human milk. *Aangeboden*.
- Muskiet FAJ, Berg GA van den, Kingma AW, Fremouw-Ottevangers DC, Halie MR. Total polyamines and their non- α -amino acid metabolites simultaneously determined in urine by capillary gas chromatography, with nitrogen-phosphorus detector; and some clinical applications. *Clin Chem* 1984; 30: 687-695.
- Berg GA van den, Muskiet FAJ, Kingma AW, Slik W van der, Halie MR. Simultaneous gas-chromatographic determination of free and acetylconjugated polyamines in urine. *Clin Chem* 1986; 32: 1930-1937.
- Berg GA van den, Schaaf JM, Nagel GT, Teelken AW, Muskiet FAJ. Determination of polyamines and metabolites in cerebrospinal fluid by isotope dilution mass fragmentationography, and a clinical application. *Clin Chim Acta* 1987; 165: 147-154.
- Berg GA van den, Kingma AW, Muskiet FAJ. Determination of polyamines in human erythrocytes by capillary gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *J Chromatogr Biomed Appl* 1987; 415: 27-34.
- Muskiet FAJ, Dorhout B, Berg GA van den, Hessels J. Investigation of polyamine metabolism by high performance liquid chromatographic and gas chromatographic profiling methods. *J Chromatogr Biomed Appl* 1995; 667: 189-198.

20. Berg GA van den, Elzinga H, Nagel GT, Kingma AW, Muskiet FAJ. Catabolism of polyamines in the rat. Polyamines and their non- α -amino acid metabolites. *Biochim Biophys Acta* 1984; 802: 175-187.
21. Berg GA van den, Nagel GT, Muskiet FAJ, Halie MR. Mass fragmentographic identification of polyamine metabolites in the urine of normal persons and cancer patients, and its relevance to the use of polyamines as tumour markers. *J Chromatogr Biomed Appl* 1985; 339: 223-231.
22. Berg GA van den, Kingma AW, Elzinga H, Muskiet FAJ. Determination of N-(3-acetamidopropyl)pyrrolidin-2-one, a metabolite of spermidine, in urine by isotope dilution mass fragmentography. *J Chromatogr Biomed Appl* 1986; 383: 251-258.
23. Muskiet FAJ, Imhoff GW van, Berg GA van den, Kingma AW, Berg HM van den, Halie MR. Urinary polyamines and their metabolites during new combination chemotherapeutic treatments of high grade non-Hodgkin lymphoma. *Clin Chim Acta* 1987; 165: 213-225.
24. Berg GA van den. Clinical relevance of polyamine metabolism. Proefschrift, Rijksuniversiteit Groningen, Krips Repro Meppel, 30 oktober 1987.
25. Berg GA van den, Kingma AW, Visser GHA, Muskiet FAJ. Gestational-age-dependent concentrations of polyamines, their conjugates and metabolites in urine and amniotic fluid. *Br J Obstet Gynaecol* 1988; 95: 669-675.
26. Hessels J, Ferwerda H, Kingma AW, Muskiet FAJ. Inhibition of polyamine oxidase in rats improves the sensitivity of urinary polyamines as markers for cell death. *Biochem J* 1990; 266: 843-851.
27. Satink HPWM, Hessels J, Kingma AW, Berg GA van den, Muskiet FAJ, Halie MR. Microbial influences on urinary polyamine excretion. *Clin Chim Acta* 1989; 179: 305-314.
28. Hessels J, Kingma AW, Ferwerda H, Keij J, Berg GA van den, Muskiet FAJ. Microbial flora in the gastrointestinal tract abolishes cytostatic effect of α -difluoromethylornithine in vivo. *Int J Cancer* 1989; 43: 1155-1164.
29. Hessels J, Kingma AW, Muskiet FAJ, Sarhan S, Seiler N. Growth inhibition of two solid tumors in mice, caused by polyamine depletion, is not attended by alterations in cell cycle phase distribution. *Int J Cancer* 1991; 48: 697-703.
30. Hessels J. Cytostatic effects of α -difluoromethylornithine against experimental tumors in vivo. Influence of gastrointestinal polyamines. Proefschrift, Rijksuniversiteit Groningen, Krips Repro Meppel, 15 november 1991.
31. Hessels J, Schopman EM, Vries GJ de, Ferwerda H, Kingma AW, Muskiet FAJ. Colonic acidification by bacterial lactulose fermentation increases urinary polyamine excretion in rats. In: Dowling RH, Fölsch UR, Löser C, eds. Polyamines in the gastrointestinal tract. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991; 425-434.
32. Dorhout B, Velde RJ te, Ferwerda H, Kingma AW, Hoog E de, Muskiet FAJ. In vivo growth inhibition of L1210 leukemia by 4-amidinoindan-1-one 2'-amidinohydrazone (CGP 48664A), a new inhibitor of S-adenosylmethionine decarboxylase. *Int J Cancer* 1995; 61: 214-217.
33. Dorhout B, Velde RJ te, Ferwerda H, Kingma AW, Hoog E de, Muskiet FAJ. In vivo effects of 4-amidinoindan-1-one 2'-amidinohydrazone (CGP 48664A) and α -difluoromethylornithine (DFMO) on L1210 growth, cell cycle phase distribution and polyamine contents. *Int J Cancer*, in press.

Summary

Manipulation of tumour cell kinetics with polyamine synthesis inhibitors. Muskiet FAJ and Dorhout B. Ned Tijdschr Klin Chem 1995; 20: 233-238.

The polyamines putrescine, spermidine and spermine are normal constituents of all cells. Inhibition of one of the key enzymes in polyamine biosynthesis, ornithine decarboxylase, with α -difluoromethylornithine (DFMO) causes polyamine depletion in cultured (tumour) cells. The depletion is accompanied by growth arrest and accumulation in the G_0/G_1 phase of the cell cycle. Subsequent administration of polyamines causes synchronized appearance of cells in S-phase, that can be exploited by administration of S-phase specific cytotoxic agents. We investigate whether this concept can be used to increase the efficacy of conventional chemotherapy in tumour bearing animals. A DFMO-induced tumour growth arrest in vivo can, however, only be accomplished by additional treatment with polyamine poor diet, non-absorbable antibiotics and an inhibitor of polyamine oxydase. This proved necessary to limit uptake of polyamines from the gastrointestinal tract and polyamines that derive from the retroconversion pathway. Under these circumstances intraperitoneally growing L1210 tumour cells accumulate in G_0/G_1 . However, Lewis Lung Carcinoma cells growing as a solid tumour exhibit no changes in cell cycle phase distribution. Studies with 4-amidinoindan-1-one 2'-amidinohydrazone (CGP 48664A), a recently developed inhibitor of the second key enzyme, named S-adenosylmethionine decarboxylase, show nearly complete effective L1210 growth arrest that is, however, not accompanied by alterations in cell cycle phase distribution. Complete L1210 growth arrest with accumulation in G_0/G_1 is obtained by combined treatment with DFMO and CGP 48664A.

Key-words: Polyamines; cancer therapy; biosynthesis inhibitors; α -difluoromethylornithine; ornithine decarboxylase; 4-amidinoindan-1-one 2'-amidinohydrazone; S-adenosylmethionine decarboxylase; tumour cell kinetics; synchronisation.